

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-500580

(43) 公表日 平成7年(1995)1月19日

第3部門第2区分

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 38/00	ADP	8314-4C	A 6 1 K 37/ 02	ADP
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)				
(21)出願番号	特願平5-504766			
(86) (22)出願日	平成4年(1992)9月9日			
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)3月9日			
(86)国際出願番号	PCT/AU92/00480			
(87)国際公開番号	WO93/04690			
(87)国際公開日	平成5年(1993)3月18日			
(31)優先権主張番号	PK8279			
(32)優先日	1991年9月9日			
(33)優先権主張国	オーストラリア (AU)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), AU, CA, J P, US			
(71)出願人	ペプチド テクノロジー リミテッド オーストラリア国 2099 ニュー サウス ウェールズ ディー ホワイ インマン ロード 4-10			
(71)出願人	キングス カレッジ ロンドン イギリス国 WC2R 2LS ロンドン ザ ストランド (番地なし)			
(72)発明者	ミカエリス, ジューゲン オーストラリア国 2118 ニュー サウス ウェールズ カーリングフォード ホニ トン アヴェニュー イースト 10			
(74)代理人	弁理士 志賀 正武 (外2名)			
最終頁に続く				

(54) 【発明の名称】 糖尿病の合併症及び病因の処理方法

(57) 【要約】

本発明は糖尿病の合併症と病因との治療のための方法を提供する。この方法は (β -Ala-His)_n、(Lys-His)_n、式 R_1-x-R_2 の化合物、製薬上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製薬上許容し得る媒体、ここで n は 2-5 であり、 R_1 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファアミノが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、 R_2 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファカルボキシルが 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び X は R_1-L 又は $D-His(R_1)-R_2$ であり、ここで R_1 は空位か又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子の ω -アミノアシルであり、 R_2 は空位又はアルキル-スルフィド、ヒドロキシル、ハロゲン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、 R_3 は空位又は 1 から 12 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のカルボキシ (アルキル) アミドである、よりなる群から選択された化合物

を備えた組成物の糖尿病患者への投与を包含する。好ましくはその化合物はカルノシンである。

請求の範囲

1 (β-Ala-His)n (Lys-His)n、式R₁-x-R₂の化合物。製法上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製法上許容し得る塩。ここでnは2-5であり、R₁は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-アミノが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、R₂は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-カルボキシルが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及びXはR₃-L又はD-His (R₄)-R₅であり、ここでR₃は空位か又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のω-アミノアシドであり、R₄は空位又はアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、R₅は空位又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物を調える組成物を試験管に投与することを備えた腫瘍病態における合併症と腫瘍病の病態の治療方法。

2 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。

3 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

4 R₁とR₂がL-又はD-リジン又はL-又はD-アスパラギン酸又はL-又はD-グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。

5 前記組成物がさらにアミノグアニンを調えることを特徴とする請求の範囲第1項から第4項のうちいずれか1項記載の方法。

6 前記組成物がインシュリンホルモンの炭水化物、ピグアニジン及び/又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第1項から第5項のうちいずれか1項記載の方法。

7 前記組成物が注射、経口、吸入、点眼、イオン導入法又は局所付加

13 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の使用。

14 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第13項記載の使用。

15 R₁とR₂がL-又はD-リジン又はL-又はD-アスパラギン酸又はL-又はD-グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第12項記載の使用。

16 前記薬がさらにアミノグアニンを調えることを特徴とする請求の範囲第12項から第15項のうちいずれか1項記載の使用。

17 前記薬がインシュリンホルモンの炭水化物、ピグアニジン及び/又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第12項から第16項のうちいずれか1項記載の使用。

18 前記薬が注射、経口、吸入、点眼、イオン導入法又は局所付加によって投与されることを特徴とする請求の範囲第12項から第17項のうちいずれか1項記載の使用。

19 前記薬が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第12項から第18項のうちいずれか1項記載の使用。

20 前記化合物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収/吸着、皮膚透皮及び/又は皮膚病変に際しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第12項から第19項のうちいずれか1項記載の使用。

21 前記分子が、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第20項記載の使用。

22 前記化合物が薬剤前駆体の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第12項から第21項のうちいずれか1項記載の使用。

によって投与されることを特徴とする請求の範囲第1項から第6項のうちいずれか1項記載の方法。

8 前記組成物が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のうちいずれか1項記載の方法。

9 前記組成物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収/吸着、皮膚透皮及び/又は皮膚病変に際しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第1項から第7項のうちいずれか1項記載の方法。

10 前記分子が、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第9項記載の方法。

11 前記化合物が薬剤前駆体の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第1項から第10項のうちいずれか1項記載の方法。

12 腫瘍病の合併症と病態の治療のための薬の調製において、(β-Ala-His)n (Lys-His)n、式R₁-x-R₂の化合物、製法上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製法上許容し得る塩、ここでnは2-5であり、R₁は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-アミノが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、R₂は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファ-カルボキシルが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及びXはR₃-L又はD-His (R₄)-R₅であり、ここでR₃は空位か又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のω-アミノアシドであり、R₄は空位又はアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、R₅は空位又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物の使用。

明 細 書

腫瘍病の合併症及び病態の処理方法

本発明は、腫瘍病の合併症と病態の処理方法に関する。

ジベプチドであるカルノシンは、両から得られる無安定性抽出物質として、約90年前に発見された(Golevitch & Alradzibi, 1990)。以来これら初期の抽出物については、ジベプチドの分布と代謝に関する多くのデータが蓄積された。カルノシン(β-アラニル-L-ヒスチジン)、及びアンセリン(β-アラニル-L-メチル-L-ヒスチジン)やホモカルノシン(γ-アミノ-ブチル-L-ヒスチジン)のような、その関連化合物は、多数の哺乳動物の神経筋(2-30mM)や脳(0.3-5mM)を含む組織に、ミリモル濃度で存在している。ジベプチドのこの群の、生理学的機能を説明するための統一された仮説は存在していないが、それらの抗酸化特性、放射線障害からのDNAの保護能力、二硫カチオンのキレート能、生理的pH値での顕著な緩衝能力から、それらのインビボでの主要な機能が、タンパク質、脂質及び他の巨大分子を保護するものであるとの提案がなされた。

自由ラジカル捕獲剤としての機能に付け加えて、カルノシンは「免疫調節剤」として作用し(ナガイ(Nagai)特許、GB 2143732A)、それは、ある種の癌治療に有効な性質を持つことが主張されている(ナガイ、特許 DE 3424781A1)。カルノシンは、過酸化脂質に誘起された日野の癌にも有効であることが示された(Bavishayan, 1989)。また、カルノシンは、外傷の治癒過程を促進できるという証拠もある。

非酵素グリコシレーション(glycosylation)

自由ラジカル障害は、タンパク質及び核酸の構造に作用する唯一の過程ではない。非酵素グリコシレーション(グリケーション(glycation))である。食物化学におけるメイラード反応(メイラード, 1912)または褐色反応は、アミノ基と糖アルデヒドまたはケト基との反応を含み、それは炭性アミノ基を生成し、結局グリコシレーションが進行した最終生成物(advanced-glycosylation-end-pr

2. 好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

第2の態様において、本発明は、 $(\beta\text{-Ala-His})_n$ 、 $(\text{Lys-His})_n$ 、一般式 R_1-X-R_2 の化合物、それらの変異上許容される塩、及びそれらの組合せからなる群から選ばれた化合物の、糖尿病の合併症及び病態の処理用医薬品の合成における用途である。ここで、 n は2-5、 R_1 は1または2の天然発生アミノ酸、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでエステル化された α -カルボキシルを有していてもよい。 R_2 は1または2の天然発生アミノ酸、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでアセチル化された α -アミノを有していてもよい。また、 X は R_3 -または $D-His(R_4)-R_5$ であって、 R_3 は空位または炭素数1から12、好ましくは2から6の ω -アミノアルキルである。 R_4 は空位またはアラルキル-スルフィド、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ基で修飾されたイミダゾールであり、 R_5 はボイドまたは炭素数1から12、好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

本発明の好ましい実施態様では、 R_1 及び R_2 は、 L -または D -リジンあるいは L -または D -アスパラギン酸あるいは L -または D -グルタミン酸あるいはそれらの相同体である。本発明の好ましい実施態様では、その化合物はカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、 D -カルノシン、及びカルシニンからなる群から選ばれ、最も好適には、化合物はカルノシンである。

本発明のさらに好ましい実施態様では、その組成物は、アミノグアニジンのような、糖尿病の合併症及び病態の処理に有利な効果をもたらす他の化合物を含む。さらに、多くの治療されるべき患者がインシュリンスルホニル尿素、ビッグアニド、またはノミリン経路治療を受けていてもよく、本発明の組成物は、そのインシュリンスルホニル尿素、ビッグアニド、またはアミリン経路治療と併投与してもよい。

スルホニル尿素ビッグアニド治療についてのさらなる情報は、ベック・ニールセン(Beck-Nielsen)の"Pharmacology of Diabetes" C E Høgenesen と C Stan d l 編、1991、pp73-92、そこに含まれる参考文献の開示に見いだされる。

上で述べたように、その組成物は注射によって投与してもよい。例えば、無菌の注射可能な水性もしくは油性懸濁液のような注射可能な製剤は、適宜の分散または懸濁剤及び懸濁剤を使用して、当業者によく知られた方法に従って製造できる。その無菌の注射可能な製剤は、非毒性で非刺激性に許容される希釈剤またはお塩中の、無菌注射可能な塩または懸濁液でもよい。採用してよい塩及び溶媒は、水、リンゲル液、及び生理食塩水である。さらに、無菌の固定剤(fixed oil)は、油または懸濁液として、従来通り採用することができる。この目的のために、合成モノ-ジグリセリドを含む任意の種々な固定油を採用してよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射可能な製剤で使用できることがわかった。

その組成物の投与すべき日毎の全投与量は、治療されるべきホスト及び特に投与方法に依存するだろう。ある特定の患者への特定の投与量レベルは、採用されたその特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康、性、食料、投与時間、投与経路、投与速度、及び患者が受ける副作用の量を含む要因の質に依存することは理解できであろう。必要とされる投与量レベルの選択は、この分野の熟達した者の専門的技術の範囲内であると見られる。

カルノシンの投与量は、20 mg から 2 g/体重 kg/日であり、好ましくは100 mg から 200 mg/体重 kg/日であろうと見られる。

上で述べたように、糖尿病に罹患した合併症のひとつは白内障である。従って本発明の組成物の投与の特に好ましい形態は、点眼である。この状況において、製薬上許容されるキャリアは、無菌の水性または非水性懸濁液、懸濁液、乳化液、及び散剤である。点眼に適した製薬上許容される媒体の例は、プロピレングリコール及び、製薬上許容されるアルコール、ゴマまたはビーナツブ油及び他の製薬上許容される油、石油ゼリー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース塩、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのような水溶性の塩に許容される非毒性ポリマー、ポリアクリル酸塩、アクリル酸エステル、ポリアクリルアミドのようなアクリレート、ゼラチン、アルギネート、ペクチンのような天然物、酢酸デンプン、ヒドロキシエチルデンプンエーテル、ヒドロキシプロピルデンプンのようなデンプン誘導体、同様に、ポリビニルアルコール、ポ

リビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレノキド、カルボポール(carbopol)及びキサンタンガムのような合成誘導体、そしてそれらのポリマーの混合物である。そのような組成物は、緩衝剤、保存剤、防腐剤、乳化分散剤のような補薬を含んでもよい。好ましい保存剤は、四級アンモニウム化合物、フェニル水酸塩、ベンゾイルアルコール、フェニルエタノールなどの抗菌剤、及びメチルサルフィドナトリウムのような酸化防止剤を含んでいる。好ましい緩衝剤は、ボレート、アセテート、グリコネート及びホスフェート緩衝剤を含んでいる。製薬的な点眼の組成物はシリッド・インサート(solid insert)の形態であってもよい。

これまでの議論で明らかのように、糖尿病の合併症及び病態は、非酵素的グリコシレーションを減少または防止することによって処理できる。従って、本発明の方法は、非酵素的グリコシレーションによる他の疾患状態の、他の有害な合併症及び病態の処理に有効であることが予想できる。

本発明の性質がより明確に理解されるために、好ましい形態を、以下の実施例及び図面を参照して説明する。

第1図は、 L -カルノシンと糖との反応速度を示す。 L -カルノシン(60 mM)は、pH7の50 mMナトリウムリン酸緩衝液中で、5時間60℃で、糖(180 mM)と反応させ、カルノシンの目印アミノ基の減少を HPLC によって決定した。SEM (母液混合物中の全カルノシンの±1%)

第2図は、カルノシンのアテローム性動脈硬化症に対する影響を示す。(ニコレスチロール、ニコレスチロール+カルノシン)

第3図は、糖尿病ラットにおける白内障の形成に対するカルノシンの影響を示す。(無塩、図2緩衝液、図2緩衝液+カルノシン)。

発明の追加説明

方法

糖に対するペプチドとアミノ酸誘導体との反応

別の方法を除き、反応は、60℃の水浴中、密封されたマイクロ反応管を用いて、アルの中、リン酸塩で緩衝化された塩溶液、PBS、(140 mlのNaCl/

(非還元糖)により置換される。グルコースまたはソルビトール(50 mMのリ
ン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0)の中、250 mg/ml)の500 μlは、
18時間、50℃で、異なるアミノ酸またはカルノシン(500 mM)を用いて
インキュベートされる。その結果生じる溶液の400 nmの光学濃度が測定され
る(表2)。カルノシンは、最も早く反応するアミノ酸、L-リジン又はベータ
-アラニンの各々よりも、約2倍、または、8倍以上に、より多くのメイラード
反応生成物を形成する。少量のメイラード反応の生成物は、カルノシンがソルビ
トールと反応したときに、多分還元糖へのソルビトールの自動酸化のために明白
となる。

[以下空白]

表2表

グルコース又はソルビトールとジペプチド又はアミノ酸との間のメイラード反
応生成物の400 nmでの吸光度

インキュベーション条件	OD 400 nm
グルコース+PBS	0.175
グルコース+カルノシン	8.455
ソルビトール+PBS	0.000
ソルビトール+カルノシン	0.209
カルノシン+PBS	0.041
グルコース+D, L-アラニン	0.266
ソルビトール+D, L-アラニン	0.008
グルコース+ベータ-アラニン	1.240
ソルビトール+ベータ-アラニン	0.010
グルコース+L-アルギニン	0.469
ソルビトール+L-アルギニン	0.010
グルコース+L-リジン	1.70
ソルビトール+L-リジン	0.009
グルコース+イミダゾール	0.046
ソルビトール+イミダゾール	0.035

表3表

カルノシン、関係するペプチド及びアミノ酸とジヒドロキシアセトンの反応

カルノシン、関係したペプチド及びアミノ酸に対するDHAの反応率を比較す
る(表3表)時に、カルノシンはリジンよりも速やかに反応し、ジペプチドがグ
リケーションのためのアミノ基の他のソースに対して競合できることを示唆して
いる。しかしながら、この定量においてリジンはその反応に寄与する2つのアミ
ノ基を有しているのに、タンパク質中ではイブシロンアミノ基のみが有効に使
用される。イブシロンアミノ基の単独のグリケーション割合の比較は、アルファ
アミノ基を基とする、N-アルファ-カルボベンゾキシル-L-リジン(Z-リジン

)が用いられる。DHAがZ-リジンのカルノシンの等モル混合液に添加される
時、そのジペプチドは遊離アミノ酸よりも速やかに、約10倍の反応をする(第
3表)。相対的な反応性は、グルコースが多糖化の糖として置換されるときに保
持され、その実験は10日間を完全に要する(表示せず)。蛋白質内に合併され
たリジン残基によく類似した分子であるAc-Lys-NHMeは、カルノシン
と比較してDHAとより速い反応を示した。ペプチドAc-Lys-His-NH
H₂は蛋白質中の優先のグリケーションサイトに類似し、カルノシン残基のよう
な同様の作用を示した。ペプチドのベータ-アラニル-グリシンはDHAと実質
的に反応せず。異なるグリケーションのためのペプチド中の2つの位置でヒス
チンのための要求物が提供される(ShiltonとValton, 1991)。D-カルノ
シン(ベータ-アラニル-D-ヒスチジン)が自然出現アイソマーと同じくらい
速く反応する間に、より高い割合での、相同カルノシン(ガンマ-アミノ-プ
チリル-L-ヒスチジン)はゆっくりと反応した。これは、カルノシンに小さな側
面上の変更(メチレン基の付加)がその反応性を減じていることを示す。それは
また、各種の高によるリジンの置換が反応率に関して意味のある効果を持してい
ることが明白となる。Ac-Lys-NH₂Me(遊離アミノとカルボキシル基
)がより速やかに反応するのに対し、Z-リジンは遊離アミノ酸よりもゆっくり
と反応した。

それはまた、遊離イミダゾールとサクシニルヒスチジン(アルファアミノ基
が遊離された)が、ジペプチドのアミノ基の損失の割合の増大によって示される
ようなDHAとカルノシンの反応性を増進させることが見出された。これは、ア
マドリヒンの酸として又はAGE-生成物に向う反応の平衡をそれによって変
化させる中間の形態との反応のいずれか一方のイミダゾールであることの示唆と
一致している(ShiltonとValton, 1991)。

[以下空白]

表3表

化合物	反応した%
A ベータ-Ala-L-His-OH	2.6
ベータ-Ala-D-His-OH	2.6
Ac-Lys-His-NH ₂	2.5
Ac-Lys-NH ₂ Me	2.1
H-Lys-OH	1.7
ガンマ-アミノ-プチリル-His-OH	1.5
Z-Lys-OH	3
ベータ-Ala-Gly-OH	2

B ベータ-Ala-L-His-OH + 77% Z-Lys	3.3
ベータ-Ala-L-His-OH + (27% Z-Lys)	4.3

ペプチドのグリケーションとDHAによるアミノ酸の損失。

AとBの化合物は60℃で5時間のあいだPBS中でDHAと反応させ、遊離
アミノ基の損失をHPLCによって定量した。データはDHAと反応したアミ
ノ基のパーセントとして表現した(インキュベーション混合物中の全ペプチド又は
アミノ酸のSEM ± 1%)。Bは、サクシニル-Hisとイミダゾールはベ
ータ-Ala-L-His-OHと定量化した後のアミノ基に等モル濃度で添加し
た。

表4表

グリケート化アミノ酸とグリケート化カルノシンの実質原性の特性

リジンとアルギニンのようなグリケート化アミノ酸(glycated amino acids)
はHaronとAnes(1983)“エイムス試験”によって最初に提示された分析システ

ムにおいて実質活性のあること (Ii. 5, 1991) が報告されている。他のプロリンとシステインのようなグリケート化アミノ酸は実質活性が示されていない。我々は、カルノシンの実質活性を調査し、またL-カルノシン、L-リジン及びL-アラニンからグリケート化している (第4表)。4つの試料の全ては、特に250 μ l投与で、何らかの指示性の抑制が得られた。我々のデータでは、グリケート化されたL-リジンが実質活性であり、それによって免疫性があるであろうという (Ii. 5 (1991)) による前の結果と一致する。その活性は、ラット肝のS-9代謝活性化システムによってわずかに増加する。グリケート化されたL-アラニンは以前の報告とは異なり実質活性であり、我々の実験においては実質活性でないことを示した。通常カルノシンとグリケート化されたカルノシンの両方は実質活性ではなかった。これは、インビボのメイラード反応において重要な役割をカルノシンが演じるであろうことが予測されるであろう。L-カルノシンとL-リジンのグリケート化の形態の差異の理由は知られていない。

(以下空白)

第4表

T A 1000によるプレート中の免疫反応			
化合物	投与 (μ l)	S-9なし	S-9あり
L-カルノシン	250	158 \pm 11	149 \pm 13
	50	154 \pm 14	179 \pm 15
グリケート化されたL-カルノシン	250	142 \pm 17	158 \pm 19
	50	159 \pm 7	167 \pm 10
グリケート化されたL-リジン	250	277 \pm 21	244 \pm 13
	50	357 \pm 17	353 \pm 19
L-アラニン	250	145 \pm 6	146 \pm 9
	50	160 \pm 9	161 \pm 10
結核コントロール			
+アジド		161 \pm 6	188 \pm 10
+2 A F		>1000	N/A
+2 A A F		N/A	250 \pm 33
		N/A	500

グリケート化された化合物の実質活性ポテンシャル

サルモネラ タイフィリウム (*Salmonella typhimurium*) T A 1000は、his⁺からhis⁻への突然変異の指示係である。データはプレート中の免疫

細胞の平均値と、ラット肝のミクロソーム的な (S-9) 変異物によって代謝性変異の有るものと無いもののそれらの試験形態とコントロールのための標準偏差とを算出した。

実験例6

非酵素的なグリコシレーションによる抑制としてのアミノグアニジンとカルノシンの比較

ウシ血清アルブミン (BSA) とオボアルブミンのグリケーションに関するカルノシンとアミノグアニジンの両方の効果の比較は、DNAの一定量と、抗グリケーターのいずれかについて濃度を表したものを50 μ lでインキュベートしてなされた。反応の出現時間と7時間経過後の一定部分を取り、反応物の異物はスパーロス6 (Sperose 6) カラムによるゲルろ過によって分析した。蛋白質の糖化とフラグメント状態は、コントロールとして使用した未処理の蛋白質と比較した保持時間中の変化として目に見えて明確となる。幾つかの化合物は、最も小さな化合物のために理論上の保持時間の後に現れた。それらは高いイオン濃度と溶剤 (フーリン20) の存在で一種のカラム樹脂で固定される傾向がある。それらは小さな化合物の必要性ではなく、むしろ高い反応性と反応性である。第5表にそのデータを要約する。2つの化合物はこのシステムにおいて別々に反応すると思われる。カルノシンは高分子量の化合物の形成が抑えられ、アミノグアニジンに比べ低い濃度で実質的に多くの効果がある。反応生成物が検出されない全てのアミノグアニジン試料は高濃度で酸性に形成される (低分子量の形態LMW) として記載され、何故ならばその保持時間は他の全ての化合物での既知より長い。アルブミンモノマーのピーク面積が抑えられることから、これらはオボアルブミン、アミノグアニジンとDNAの間の反応生成物であろう。3つの化合物の全ては、保持時間又はピーク面積が7時間のあいだ両方の条件のもとで別々にインキュベートされる時に変化しないことが示された。LMWはまた、オボアルブミンがインキュベーション混合物中のウシ血清アルブミンによって取替えられる時に既知される (記載せず)。そのLMWはカルノシン試料中に少しも存在していない。

第5表

オボアルブミン			
クロマトグラムの面積パーセント			
	HMW	モノマー	LMW
0時間			
カルノシン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
アミノグアニジン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
7時間後			
カルノシン試料			
[A]	9	91	0
[B]	6	94	0
[C]	3	97	0
[D]	25	75	0
[コントロール]	68	32	0
アミノグアニジン試料			
[A]	0	31	69
[B]	8	20	72
[C]	0	41	49
[D]	38	40	22
[コントロール]	68	32	0

凡例・オボアルブミンは、カルノシン又はアミノグアニジンのいずれか一方が各組の重量で存在する中で7時間のあいだUHAと一緒にインキュベートした。反応生成物はグルコースカラム（スパローズ6）で分離し、ピークは保持時間によって分離した・HMMW 高分子量（15-30分）；アルブミンモノマー（35分）；及び遊離して放出する化合物LMW、低分子量（>40分）。カルノシンとアミノグアニジン濃度は【コントロール】0 mM、【A】600 mM、【B】300 mM、【C】100 mM、【D】50 mM。

抗-グリケター有効性のために良い尺度は、反応の7時間後に存在する未反応のアルブミンの量である。この点でカルノシンはアミノグアニジンと比べ全ての濃度でより有効であった。

実施例1

アテローム硬化症におけるカルノシンの効果

冠動脈心臓疾患は糖尿病及び同様に非糖尿病の最も多い死因の一つである。グリケーションはアテローム性プラーク（atherosclerotic plaques）に加え、糖尿病性網膜や目の疾患を含む多くの糖尿病合併症の進展を包含している。コレステロール結晶ウツギは8週間の期間を超えてアテローム性プラークに関するカルノシンの効果を試験に使用した。我々の研究では、カルノシンによりグリケーションの抑制がプラーク形成を遅延させることができることを示している。これらの結果は第2図に示される。

そのデータののための2つのテールPはマン-ホイットニー（Mann-Whitney）の2サンプル試験を用いて算出した：両部大動脈=0.0529；腹部大動脈=0.3368；大動脈弓=0.8623。全てのデータはアミノグアニジン（n=11）給餌に対して糖尿病コントロール（n=12）。その他の動物は統計的により良い結果を与えるこの研究において使用した。しかしながら、これらは非糖尿病グリコシル化の抑制の両方がプラーク形成を遅延させることを明確に示す。

その動物の体重は8週間の処理期間を超えて減少し、しかしながらコントロールとカルノシン処理群の間で差はなかった。

させるであろう。我々はストレプトゾトシンを導入した糖尿病ラットモデルにおいてこれを試験している。カルノシン食餌動物について8週後は、糖尿病コントロール群（Mann-Whitney 2サンプル試験 2テールP値=0.2092；カルノシン給餌に於ける糖尿病コントロール）に比べて高度な明瞭性（混濁なし）を示した（第3図参照）。これは56日で測定されて以来、実験の半路まで、その傾向がカルノシン給餌によって白内障の形成における減少として示される。

白内障は動物モデルにおける糖質の減少のみでなく誘発させることができる。バビズハエ（Babishayev, 1989）は過酸化した脂質が動物モデルにおいて進展する糖尿病の開始的原因の一つと見做ることを示している。リポソームの脂質の注入は後方下白内障の進展を誘発する過酸化した脂質を含有するリン脂質から調製した。両様な白内障モデルによる彼の発見は過酸化した脂質に基き、カルノシンと類似の抗酸化剤によって抑制し得る。メイラード反応生成物の形成は、しかしながら、経路に従って、抗酸化剤によって影響を及ぼすことができる。

【以下余白】

コントロールに対するカルノシン処理において観察された各種器官の重量に差はなかった。

	体重 kg	
	0週	8週
コントロール	3.27 ± 0.09	2.75 ± 0.17
カルノシン	3.33 ± 0.09	2.68 ± 0.12

	8週処理後の器官の重量 (g)		
	肝臓	腎臓	心臓
コントロール	135.94 ± 5.06	16.20 ± 0.67	1.92 ± 0.53
カルノシン	124.40 ± 6.36	17.33 ± 0.69	6.12 ± 0.27

実施例2

糖尿病ラットにおける白内障の形成に関するカルノシンの効果

白内障は十分な視力が必要な視覚レンズの混濁化である。糖尿病は、白内障の原因の一つの形態が糖尿病であるということが多くの年月と多くの臨床試験で支持されるという観点により糖尿病と関連付けられている。動物中の糖尿病はストレプトゾトシン（streptozotocin）によって誘発させることができ、レンズの混濁は注射20日後により遅延的に発生するが、混濁は注射時の年齢によって約100日後に出現した。

レンズの蛋白質を含んだ蛋白質への糖質の白内障内転は、確認され、定量されている。最も多数の組織では糖尿病において一様な後期のメイラード生成物の少しの蓄積があるが、レンズ中の蛋白質は早期のグリケーション生成物の蓄積は多くなく、黄色のメイラード生成物に変化するそれらの時間を有する。化学的異性体と酵素の両方変性化試薬の各種を生じる糖質の最初の攻撃は、蛋白質とレンズの結晶とそれら各々の経路が損傷を生じ得る。糖質の反応性アルデヒド基を測定可能なものとカルノシンに類似する化合物とは白内障の開始を減少

実施例3

糖尿病ラットにおける蛋白質、グリケート化したヘモグロビンと血中グルコースレベルに関するカルノシンの効果

8週で有意の変化のないことが次のパラメーターについて観察された。

アルブミン尿		
過剰	糖尿病	糖尿病+カルノシン
2.4x/±1.3	2.51x/±1.07	2.51x/±1.48
グリケート化したヘモグロビン (HbA1c) パーセント		
過剰	糖尿病	糖尿病+カルノシン
1.5±0.1	4.83±0.23	4.49±0.14
血中グルコース (mM 値+SEM)		
過剰	糖尿病	糖尿病+カルノシン
10.0±1.5	29.84±4.88	22.63±3.00

蛋白質と糖質における変化は糖尿病条件の約30週後に唯一観察することができる。そのアミノグアニジン化合物、非酵素的グリコシレーションの防止のための有効な使用は、第3図の糖尿病モデルにおいてグリケート化したヘモグロビンの量が減少することはない。この研究は現在継続している。

明日に提示されたような発明の種又は範囲から逸脱することなく、特有な実施態様において示したような本発明により各種の変異及び/又は変形が形成されるであろうことは当業者においては明らかとなるであろう。本発明の実施態様は、それ故、提示としての全ての図面において考慮されるものであり、それに限定されるものではない。

【以下余白】

文献

Gulovitch, Y. & Amirembi, S. (1900) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 1902-1903
 Maillard, L. C. (1912) C. R. Acad. Sci. 154, 66-68
 Shilton, B. B. & Valtos, D. J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 5587-5592
 Hannes, H. P., Martin, S., Federlin, K., Brownlee (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11555-11558
 Kim, S. B., Kim, I. S., Yoon, D. H. & Park, Y. B. (1991) Mol. Res. 254, 65-69
 Maron, D. M. & Auer, B. M. (1983) Mol. Res. 113, 173-215
 Babishayev, M. A. (1989) Biochimica et Biophysica Acta 1004, 363-371

〔以下空白〕

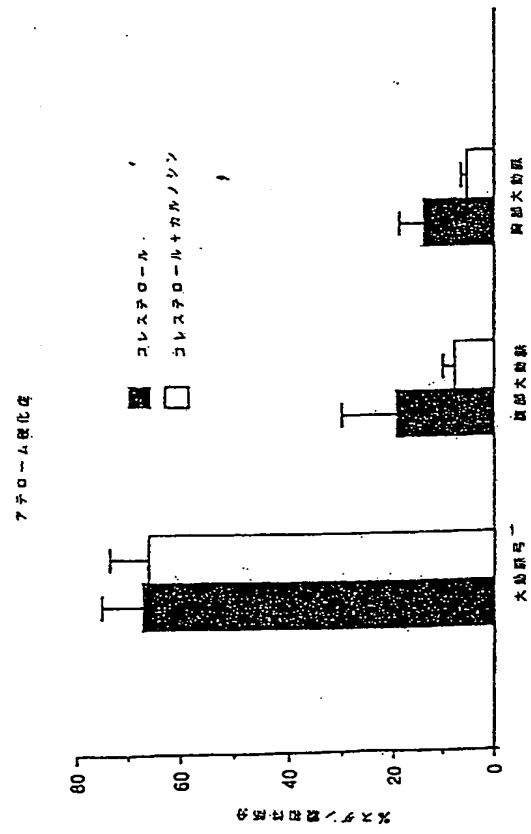


図2

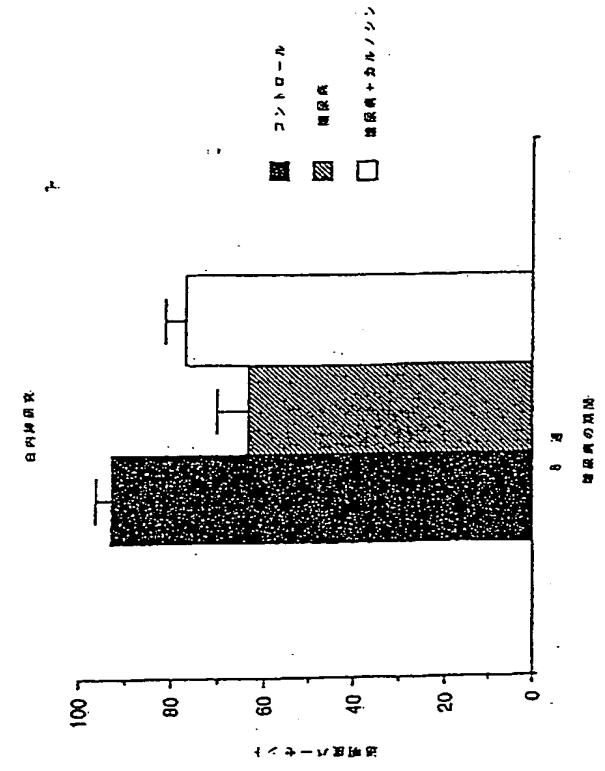


図3

カルノシンと糖の反応

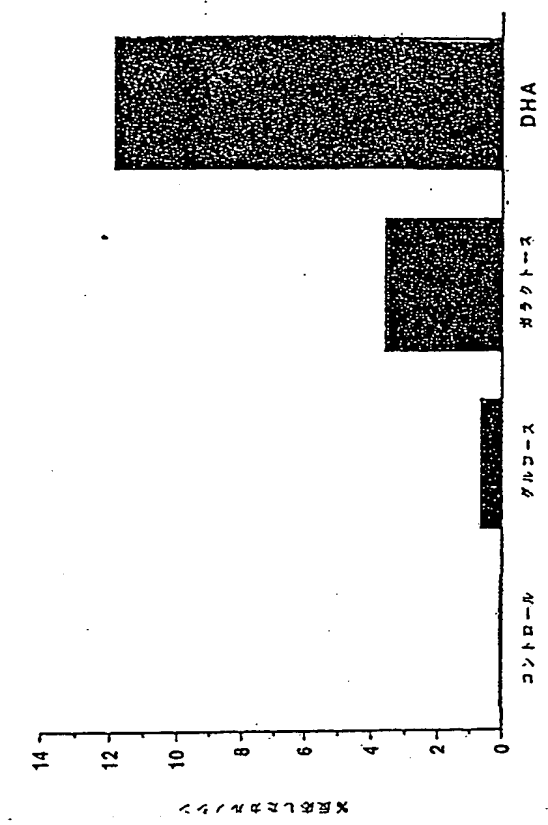


図4

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00489

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER. In Cl. 5 A61K 32/02	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Mandatory documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC A61K 32/02	
Documentation searched other than mandatory documentation in the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above	
Drawings have been searched during the international search (none of data base, and where practicable, patent term maps) DERWENT; CHEM ABSTRACTS AND WHAT DATABASES USING THE KEYWORDS: CARBOSINE, NOMO CARBOSINE, ANSERINE, NOMO ANSERINE, OPRENDINE, CARBOSINE AND DIABETES	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Number of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages Referred to in this No.
X ✓	EP A,313,504 (ZEDRA PHARMACEUTICAL CO. LTD. AND HAMARI CHEMICALS, LTD.), 3 May 1989 (02.05.89) page 5 lines 11-16, page 7 lines 2-4 12-15, 18-21
X ✓	EP A,303,180 (HAMARI TAKUHI KOTOY KABUSHIKI KAISHA) 13 February 1989 (15.02.89) page 2 lines 43-49, and the claims 12-15, 18-21
X ✓	US A,471,771 (KINVESTRO NAGAI AND TAIKO SUDAI), 3 January 1988 (03.01.88) columns 1 lines 39-46, columns 9-10 lines 2-4, and the claims 12-15, 18-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
Special categories of cited documents: "A" documents disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" prior art documents not published in a form which is not available to the public "C" documents which have been cited as prior art in the international search report "D" documents which have been cited as prior art in the international search report "E" documents which have been cited as prior art in the international search report "F" documents which have been cited as prior art in the international search report "G" documents which have been cited as prior art in the international search report "H" documents which have been cited as prior art in the international search report "I" documents which have been cited as prior art in the international search report "J" documents which have been cited as prior art in the international search report "K" documents which have been cited as prior art in the international search report "L" documents which have been cited as prior art in the international search report "M" documents which have been cited as prior art in the international search report "N" documents which have been cited as prior art in the international search report "O" documents which have been cited as prior art in the international search report "P" documents which have been cited as prior art in the international search report "Q" documents which have been cited as prior art in the international search report "R" documents which have been cited as prior art in the international search report "S" documents which have been cited as prior art in the international search report "T" documents which have been cited as prior art in the international search report "U" documents which have been cited as prior art in the international search report "V" documents which have been cited as prior art in the international search report "W" documents which have been cited as prior art in the international search report "X" documents which have been cited as prior art in the international search report "Y" documents which have been cited as prior art in the international search report "Z" documents which have been cited as prior art in the international search report	
Date of the international search report 15 December 1992 (15.12.92)	
Date of mailing of the international search report 24 Dec. 1992 (24.12.92)	
Name and mailing address of the ISA/II AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WOODEN HILL 3506 AUSTRALIA Postable No. (06) 2532929	
Authorized officer TAMARA MEZDEK Telephone No. (06) 2532989	

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form 2001 July 1992) COPLIN

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Number of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to in this No.
X ✓	US A,450,872 (KINVESTRO NAGAI AND KINUKO NAGAI), 2 April 1983 (22.04.83) columns 5 lines 20-44, column 6, columns 7-11	12-15, 18-21
X ✓	WO A,900,610 (PEPTIDE TECHNOLOGY LIMITED), 14 June 1990 (14.06.90) page 3 lines 11-21	12-15, 18-21

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form 2001 July 1992) COPLIN

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00489

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member			
WO 9006102	AU 43320/89	EP 436611		
EP 313654	JP 63014728	US 4927817	WO 1800048	
US 4717716	CH 646183	DE 3540632	DK 500513	
	FR 2577128	GB 2170707	JP 61184323	
	NL 8600112	SE 8505121		
EP 302199	IT 1043671	US 4781840		
US 4306721				
END OF ANNEX				

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) July 1992 COPLIN

フロントページの続き

(72)発明者 ヒブキッス, アラン ロジャー
イギリス国 SE12 0UF ロンドン
リー ゲイブルス クローズ 83

(72)発明者 バナジオトパウロス, シアンナ
オーストラリア国 3108 ヴィクトリア
ドンキャスター ライアル コート 2